

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т. Г. Волова

« _____ » _____ 20 ____ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Влияние технологических параметров экстракции на выход и характеристики
ПГА, синтезируемые бактериями *Cupriavidus eutrophus*

Руководитель

подпись, дата

доцент, канд. техн. наук

должность, учёная степень

С.В. Барановский

инициалы, фамилия

Выпускник

подпись, дата

О.Д. Петровская

инициалы, фамилия

Красноярск 2018

РЕФЕРАТ

Дипломная работа на тему: «Влияние технологических параметров экстракции на выход и характеристики ПГА, синтезируемые бактериями *Cupriavidus eutrophus*» содержит 47 страницы и включает в себя 43 литературных источника, 8 таблицы, 12 формул, 8 рисунков.

ПГА, ЭКСТРАКЦИЯ ЭТАНОЛОМ, CUPRIavidus EUTROPHUS, ПОЛНОТА ИЗВЛЕЧЕНИЯ ПГА, ВЛИЯНИЕ ПАРАМЕТРОВ ЭКСТРАКЦИИ.

Цель работы: выявить влияние технологических параметров экстракции этанолом на выход ПГА.

Для достижения цели, поставлены следующие задачи:

1. Провести биосинтез бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 и получить образцы биомассы для дальнейшего исследования;
2. Исследовать влияние технологических параметров экстракции этанолом (температуры, времени, концентрации и объема этанола в биомассе) на выход ПГА и его характеристики, а также определить оптимальные параметры процесса;
3. На основании полученных результатов, предложить математическую модель влияния параметров экстракции этанолом на выход ПГА.

Экстракция полимера из биомассы является одной из основных технологических стадий процесса получения биоразрушаемых пластиков. Оценка влияния технологических параметров экстракции на выход ПГА позволит определить наиболее оптимальные условия проведения процесса и получить наибольший выход продукта с минимальными затратами.

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	2
СОДЕРЖАНИЕ	3
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 Обзор литературы	7
1.1 Полигидроксиалконаты : Структура и свойства	7
1.2 Методы экстракции ПГА из биомассы бактерий	11
1.2.1 Экстракция растворителем.....	12
1.2.2 Деградация поверхностно-активными веществами	13
1.2.3 Деградация с помощью гипохлорита натрия	14
1.2.4 Применение гидроксида натрия и гидроксида калия.....	14
1.2.5 Применение сверхкритических флюидов.....	15
1.2.6 Ферментативное расщепление.....	15
1.2.7 Центрифугирование и химическая обработка	17
1.2.8 Гомогенизация под высоким давлением с использованием растворителя	17
1.2.9 Применение ферментов и растворителей.....	18
1.2.10 Осмотический шок.....	18
1.2.11 Ультразвуковая экстракция.....	19
1.2.12 Метод шаровой мельницы	19
1.2.13 Метод селективной флотации.....	20
2 Объект и методы исследования	21
2.1 Биосинтез бактерий <i>Cupriavidus eutrophus</i> B10646	21
2.1.1 Приготовление питательных растворов и их стерилизация.....	21
2.1.2 Получение инокулята из музейной культуры	23
2.1.3 Получения инокулята в ферментёре-инокуляторе	23
2.1.4 Двустадийная ферментация в производственном ферментёре	23
2.1.5 Концентрирование бактериальной культуры.....	24
2.1.6 Центрифугирование и лиофильная сушка сгущенной культуры ..	25
2.2 Объект исследования	25

2. 3 Методы исследования.....	25
2.4 Исследование молекулярно-массовых характеристики образцов полимера, выделенных из бактериальной биомассы	Ошибка! Закладка не определена.
2.5 Метанолиз образцов.....	Ошибка! Закладка не определена.
2.6 Методы обработки данных	Ошибка! Закладка не определена.
3 Результаты.....	Ошибка! Закладка не определена.
ВЫВОДЫ	27
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	28

ВВЕДЕНИЕ

Накопление пластиковых отходов стала серьезной проблемой с точки зрения окружающей среды. Широкое использование нефтехимическое производство в связи с их универсальными свойствами, особенно вызывает серьезные проблемы в области загрязнения отходами, влияющих на эстетическое качество городов, водоемов и природных территорий. Проблемы, касающиеся глобальной окружающей среды создали большое внимания при разработке ЭКО-продуктов. Биополимеры - это один из продуктов, который может помочь преодолеть проблемы, вызванные нефтехимическими полимерами [14].

Среди различных типов биополимеров, полигидроксиалканоаты (ПГА) представляют перспективную группу полимеров, так как они являются биологически совместимые, термопластичные и не токсичные, что делает их пригодными для различных областей применения в промышленности, медицине и сельском хозяйстве [4].

Масштабы использования полиоксиалканоатов в настоящее время тормозится достаточно большой стоимостью (практически на порядок более высокой по сравнению с полиолефинами). Однако усиливающиеся требования к охране окружающей среды и имеющиеся перспективы снижения стоимости биополимеров за счет увеличения эффективности производства делают ПГА, как одним из перспективных материалов XXI века [34].

Экономические оценки показали, что затраты на выделение ПГА из клеточной биомассы значительно уменьшаются с увеличением содержания полимера в клетке. Согласно этим расчетам, при 88%-ном содержании полимера стоимость выделения составит 0,92, а при 50%-ном – 4,8 \$ США за 1 кг. Это удорожание обусловлено использованием большего количества вещества для выделения полимера [6].

При выборе метода выделения ПГА из биомассы необходимо учитывать стоимость реагентов, количество образующихся отходов, эффективность извлечения полимера, степень его чистоты [30].

Стоимость производства ПГА в основном зависит от дальнейшей обработки и, следовательно, разработка методов экстракции ПГА требуется сделать весь процесс гораздо проще и дешевле, что позволит при большой производительности снизить стоимость ПГА до 3–4 \$ США за 1 кг, которые соизмеримы со стоимостью полилактидов и алифатических полиэфиров [19].

Цель работы: выявить влияние технологических параметров экстракции этанолом на выход ПГА.

Для достижения цели, поставлены следующие задачи:

1. Провести биосинтез бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 и получить образцы биомассы для дальнейшего исследования;
2. Исследовать влияние технологических параметров экстракции этанолом (температуры, времени, концентрации и объема этанола в биомассе) на выход ПГА и его характеристики, а также определить оптимальные параметры процесса;
3. На основании полученных результатов, предложить математическую модель влияния параметров экстракции этанолом на выход ПГА.

1 Обзор литературы

1.1 Полигидроксиалконаты : Структура и свойства

Полигидроксиалканаты (ПГА) представляют собой сложный полиэфиры гидроксиалканатов (рисунок 1), которые накапливаются в виде углерода, представляющий собой запас энергии. Они синтезируются и сохраняются у большинства разнообразных бактерий (как грамположительных, так и грамотрицательных) при стрессовых состояниях и накапливаются в виде внутриклеточных гранул[20]. Одним из ключевых членов этого класса, поли-3-гидроксibuтират, впервые был обнаружен в бактериальных клетках Lemoigne в 1925 году [9].

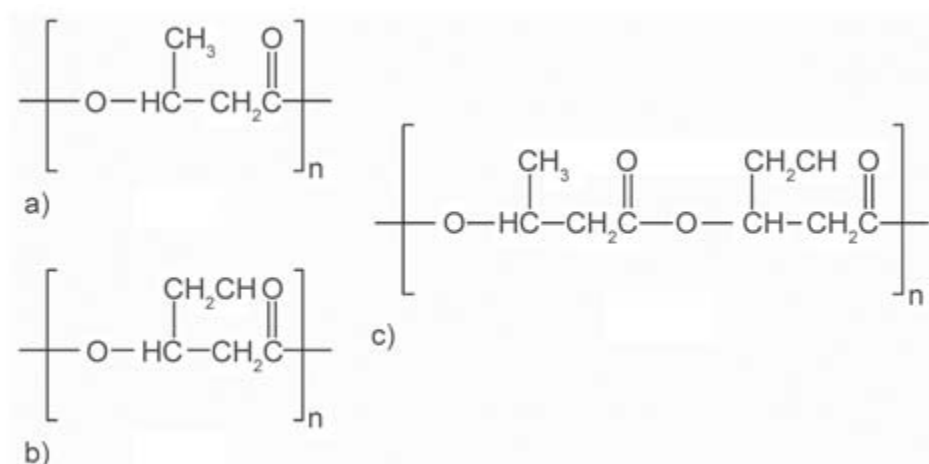


Рисунок 1- Структурные формулы некоторых полигидроксиалконатов, а) ПЗГБ, б)ПГВ, в)ПГБВ [9]

На рисунке 2 приведена микрофотография бактерий, *Alcaligenes eutrophus*. Белые области представляют собой полимерные гранулы, заключенные в цитоплазме. В оптимизированных условиях до 80% от сухого веса клеток может накапливаться как ПЗГБ. In vivo полимер синтезируется в очень высоких молекулярных массах. Это означает, что присутствие полимера оказывает небольшое влияние на осмотическое давление клетки и не мешает клеточному обмену веществ. Когда источники питания

истощаются, клетка в состоянии депонировать полимер для получения энергии, тем самым продлевая жизнеспособность до тех пор, пока не возобновится нормальное питание [9].

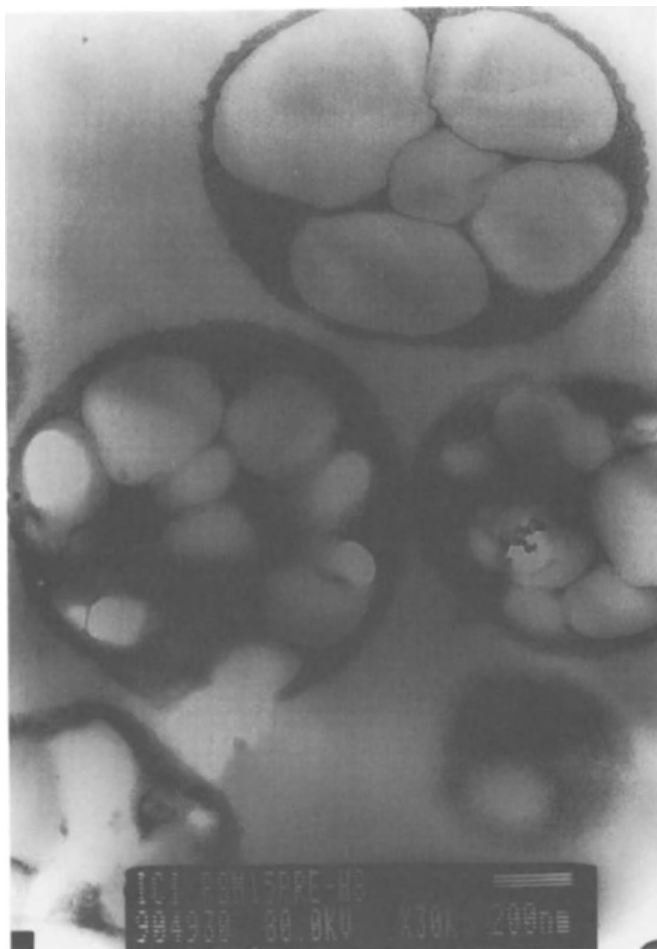


Рисунок 2- Микрофотография бактерий *Alcaligenes eutrophus* [9]

Существует два основных типа биополимеров: полимеры, полученные с помощью биологических системах (таких как микроорганизмы) и химически синтезированные полимеры на основе биологического сырья (аминокислот, сахаров, жиров)[19].

Исходя из длины углеродной цепи, полигидроксиалканоаты можно подразделять на три основные группы:

- 1) короткоцепочечные (short-chain-length, SCL, ПГА_{кц}), состоящие из кислот с длиной углеродной цепи от 3-х до 5-ти углеродных атомов;
- 2) среднецепочечные (medium-chain-length, MCL, ПГА_{сц}), в составе которых от 6 до 14 атомов углерода;

3) длинноцепочечные (long-chain-length, LCL, ПГА_{дл}) состоящие из мономеров с длиной С-цепи свыше 14 атомов углерода [28].

Среди охарактеризованных к настоящему времени полиоксисалканоатов выделено несколько групп полимеров. Основные структуры полиоксисалканоатов изображены на рисунке 3 [22].

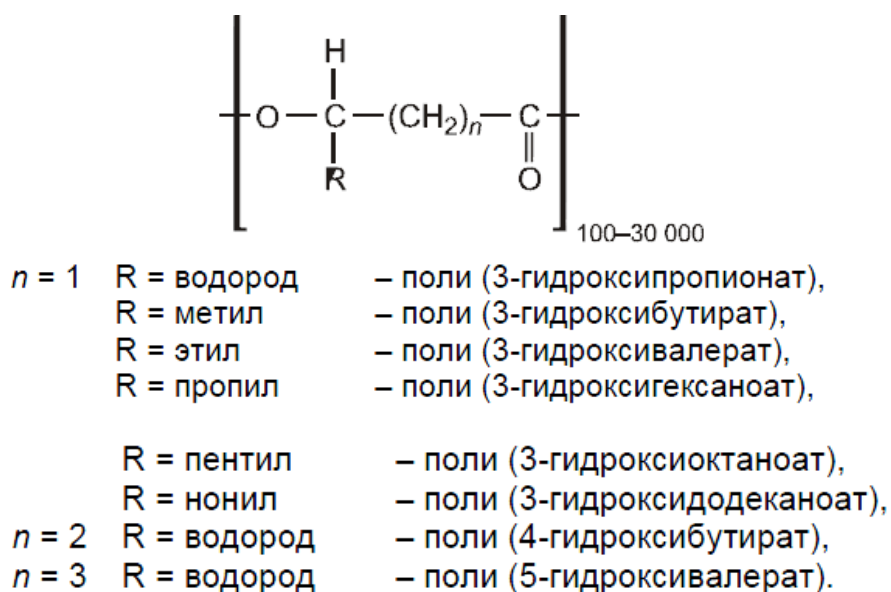


Рисунок 3 - Основные структуры ПГА.

Список микроорганизмов, способных внутриклеточно аккумулировать полиоксibuтират или продукты сополимеризации ПОБ с другими оксипроизводными жирных кислот, быстро пополняется. К настоящему времени он насчитывает свыше 300 организмов. Среди описанных организмов – аэробные и анаэробные бактерии, гетеротрофы, хемоорган- и хемотрофы, фототрофные прокариоты. (*Azotobater*, *Alcali-genes*, метанотрофы *Bacillus*, *Nocardia*, *Methylobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Zoogloea*); аэробные фотобактерии (*Chloroglaea*, *Chloro-flexus*); олиготрофные полипростековые бактерии (*Labrys*, *Prostheco-microbium*, *Stelle*), архебактерии (*Haloferax*), анаэробные фототрофные бактерии (*Chromatium*, *Rhodospirillum*) и другие [31].

Бактерии, используемые для получения ПОА, по применяемым методам культивирования подразделяют на две группы. К первой относятся организмы, эффективный синтез ПОА у которых происходит при избытке источника энергии и углерода в среде, но при лимитировании роста одним из биогенных элементов (азотом, серой, фосфором, калием, магнием или кислородом). Ко второй группе относятся микроорганизмы, характеризующиеся способностью эффективно синтезировать ПОА при высоких скоростях роста, без ограничения роста каким либо лимитирующим фактором [31].

Синтез ПГА в общих чертах сходен у различных микроорганизмов, но наиболее изучены пути синтеза полигидроксибутирата у типового штамма *Ralstonia eutropha* H16 в различных условиях несбалансированного роста. Биосинтез П(ЗГБ) инициируется конденсацией двух молекул ацетил-СоА с помощью β -кетотиолазы с образованием ацетоацетил-КоА. Впоследствии, НАДФН-зависимая ацетоацетил-СоА-редуктаза катализирует восстановление ацетоацетил-СоА к (R)-изомеру 3-гидроксибутирил-КоА, который затем полимеризуют в П(ЗГБ) с помощью ПГА-синтазы [28]. Общая схема синтеза ПГА представлена на рисунке 4 [3].

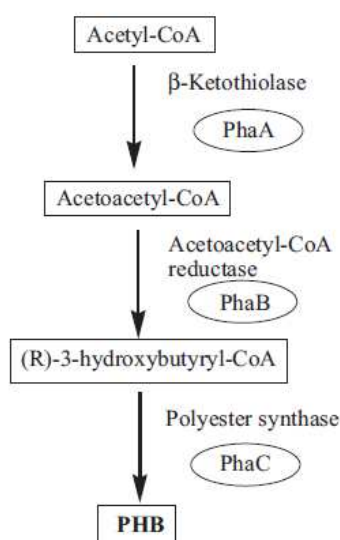


Рисунок 4 - Биосинтез полигидроксибутирата

Полигидроксиалконаты являются термопластичными и их свойства отличаются в зависимости от их химического состава (Гомо - или сополиэфир, содержащий гидрокси жирные кислоты). Некоторые ПГА аналогичны по своим свойствам с полипропиленом (PP), а также обладают хорошей устойчивостью к влаге и ароматические барьерные свойствами.

Некоторые общие характеристики ПГА:

- нерастворимый в воде и относительно устойчивый к гидролитическому разрушению;
- имеет хорошее ультрафиолетовое сопротивление, но плохое сопротивление к кислотам и основаниям;
- растворим в хлороформе и других хлорированных углеводородов;
- биосовместимые и, следовательно, пригодные для медицинских целей;
- тонет в воде, способствуя ее анаэробному биоразложению в отложениях;
- нетоксичен;
- менее «липкие», чем традиционные полимеры, в расплавленном состоянии [7,41].

1.2 Методы экстракции ПГА из биомассы бактерий

Экстракция - процесс избирательного извлечения одного или нескольких растворимых компонентов из твердых тел и растворов с помощью жидкого растворителя - экстрагента [35].

Выделение и очистка ПГА полимеров является важным шагом для их анализа и характеристики. Существует большинство различных методов, используемых для извлечения ПГА из клеток [14]. Методы извлечения ПГА из биомассы бактерий классифицируются на химические, биологические, механические (физические) методы независимых систем или в комбинации с другими процессами [6].

В настоящее время используют следующие подходы для выделения полимера: экстракцию органическими растворителями; обработку биомассы

растворами щелочей, кислот, детергентов, ферментами, а также их различные сочетания [5].

1.2.1 Экстракция растворителем

Экстракция растворителем наиболее широко применяется метод выделения ПГА из клеточной биомассы. Этот метод широко используется благодаря своей простоте и скорости. При этом используются два основных подхода: во-первых, это модификация проницаемости клеточной мембраны, что позволяет высвобождение и солюбилизацию ПГА [15]. Этот способ, в котором используют оба типа растворителя (экстракция липидов не растворителем ПГА, с последующим растворением полимера) применяется во многих исследованиях. [7]. Затем следуют осаждением без растворителя. Экстракция ПГА с растворителями, такими как хлорированные углеводороды, то есть хлороформ, 1,2-дихлорэтан, дихлорметан или некоторые циклические карбонаты, такие как этиленкарбонат и 1,2-пропиленкарбонат. Осаждение ПГА обычно проводят нерастворителем, таким как метанол или этанол. Растворитель имеет несомненные преимущества перед другими методами экстракции ПГА с точки зрения эффективности. Этот метод также позволяет удалять бактериальные эндотоксины и вызывает незначительную деградацию полимеров. Таким образом, можно получить чистый ПГА с высокой молекулярной массой. К сожалению, широкомасштабное применение экстракции растворителем, как правило, рассматривается как метод, который не является экологически чистым. Кроме того, несколько других факторов препятствуют использованию растворителей, таких как эксплуатационные расходы. Другая проблема - высокая вязкость экстрагированного раствора полимера, когда концентрация ПЗГБ превышает 5% (мас. / Об.). Вязкость раствора влияет на удаление клеточных остатков, приводящее к длительной сепаративной обработки [12,15].

1.2.2 Деградация поверхностно-активными веществами

Поверхностно-активные вещества, такие как анионный додецилсульфат натрия (ДДС- Na), разрушить клетки путем включения в липидной мембраны бислоя. Додесульфат натрия проникает в мембраны для увеличения объема клеточной оболочки, пока он не насыщается. При дальнейшем добавлении мембрана клетки разрывается, в результате образуются мицеллы ПАВ и мембран фосфолипидов, это приводит к высвобождению П(ЗГБ) в раствор, окруженного клеточными остатками. Другая функция сурфактанта заключается в солюбилизации. Сурфактант солюбилизирует не только белки, но и другие клеточные соединения.

Некоторые поверхностно-активные вещества, такие как синтетические пальмитоил карнитин, широко распространенный природный сурфактант, лизирует *R. eutropha* и *A. latus*. Уровень лизиса *R. Eutropha* составляет 70%, тогда как у *A. latus* более 85% (1 м Мальтоминоилкарнитин в буфере 0,1 М Трис-HCl, pH 7,0, 30 ° C, 60 мин). Преимущество этого метода исходит из того, что ПАВ лизирует клетки без разрушения полимерных гранул. Другой метод состоит в восстановлении П(ЗГБ) непосредственно из культуральной жидкости с высокой плотностью клеток, без предварительной обработки, путем добавления ДДС-Na, встряхивания, нагревания и промывки. В экспериментах на *R. Eutropha* было получено, чистота П(ЗГБ) более 95% и полнота извлечения > 90% с отношением ДДС-Na / биомассы выше, чем 0,4. Одним из основных преимуществ этого метода является тот факт, что он позволил восстановить ПГА непосредственно из высоких плотностей клеток: 50-300 г сухой клетки. Использование только поверхностно-активного вещества не может обеспечить высокую чистоту ПГА (> 97%), необходимы и другие агенты, такие как гипохлорит и гидроксид натрия. Кроме того, высокая доза поверхностно-активного

вещества (5 мас.%) вызывает проблемы в очистке сточных вод и их повторное использование [12,15].

1.2.3 Дегградация с помощью гипохлорита натрия

Еще один популярный метод использования гипохлорита натрия, который солюбилизирует клеточную массу и оставляет ПГА нетронутым. Тем не менее, он может разрушить ПГА, что приводит к 50% снижению молекулярной массы. Это происходит потому, что гипохлорит натрия является сильным окислителем, и значительное количество хлора остается в ПГА. Как правило, аморфные гранулы ПГА относительно восприимчивы к щелочному омылению и быстро разлагается в мономеры и олигомеры в качестве растворимых продуктов. Добавление антиоксиданта такие как бисульфит натрия может избежать дегградации молекулярного веса. Недостаток этого метода является высокая стоимость экстрагента [6].

1.2.4 Применение гидроксида натрия и гидроксида калия

Гидроксид натрия (NaOH) и гидроксид калия (KOH) оказались хорошими веществами для экстрагирования ПГА, поскольку они дешевы и эффективны, также приводящие к высокому выходу ПГА и его чистоте. Кроме того, количество используемого NaOH и KOH взято гораздо меньше, чтобы получить аналогичную эффективность извлечения. Очищенный ПГА, полученный методом с применением NaOH является более подходящим для биомедицинских целях, так как это может уменьшить количество эндотоксина в полимере. Тем не менее, щелочи могут изменить физические и механические свойства ПГА, что обусловлено значительным гидролизом полимера и его снижение молекулярной массы. ПГА с чистотой 91-92% и выходом 90-93% получали из рекомбинантной *E. coli*, содержащей ПГА ген *S. necator* с использованием 0,1 М раствора NaOH или KOH при 30° С в

течение 1 ч. Однако потери ПГА и снижение молекулярной массы наблюдалось в сильно щелочном растворе. Было подсчитано, что использование NaOH на 25% снижает стоимость экстракции, чем метод расщепления поверхностно-активным веществом [16].

1.2.5 Применение сверхкритических флюидов

Сверхкритические жидкости обладают уникальными физико-химическими свойствами, таких как высокой плотностью и низкой вязкостью, что делает их пригодными в качестве растворителей для экстракции. Для этой цели, CO₂ является наиболее широко используется из-за его низкой токсичности и реактивности, умеренный критической температуры и давления (31°C и 73 атм), доступностью, дешевизной и негорючестью [6]. Этот метод является весьма подходящим методом для частичного извлечения компонентов из биомассы и внутриклеточных метаболитов из-за возможной модификации системы по физическим параметрам и растворителям для селективного извлечения соединений различной полярности и гидрофильности, без каких-либо загрязнений [18]. Однако, этот метод до сих пор представляется дорогостоящим по сравнению с другими методами [6]. Сверхкритический CO₂ также использовали в качестве антирастворителя для получения микросфер ПГА в качестве систем доставки лекарств [17].

1.2.6 Ферментативное расщепление

Ферментативное расщепление представляет собой сложный процесс извлечения ПГА. Этот метод заключается в добавлении в клеточную биомассу ферментов для гидролиза клетки, которые содержат ПГА. Различные типы ферментов используются в этом процессе, особенно протеазы. Этот метод привлекателен из-за мягких условий эксплуатации,

высокой селективности ферментов для гидролиза белков клеточной стенки бактерий и последующего лизиса, без воздействия на полимер и качество извлеченного полимера [19].

Протеазы трипсин, химотрипсин, папаин и бромелайн, и α -глюкозидаз целлюлозы и лизоцима являются ферментами, изучаемые как способные расщеплять ковалентные связи, аналогичные найденным в пептидогликан $-\beta$ - 1,4 гликозидных звеньях, расположенных между N-ацетилглюкозамин (НАГ) и N ацетил-мурамовой кислотой (NAM) и пептидные звеньев тетрапептидов, которые соединяют полимерные цепи NAM-НАГ, самой жесткой структуры бактерий клеточной стенки. Наилучший результат получения 88.8% П(ЗГБ) чистоты была достигнута с 2.0 % бромелайн при 50 °C и pH 9.0. Эксперименты проводились также с панкреатином (в три раза дешевле, чем бромелайн), что приводит к 90 % чистоты полимера [20].

Также проводились исследование на оценку использования протеаз Corolase® L10, Alcalase® 2.4L, Corolase® 7089 и Protamax® FC, гликозидазы Celumax® BC, Rohament® CL и Rohalase® по извлечению ПГА, синтезируемых *Cupriavidus necator*. Фермент Celumax®BC обеспечивает лучший лизис бактериальной клеточной мембраны и результаты по оптимизации эксплуатационных условиях показали, что этот фермент наиболее стабилен в ацетатном буфере при pH 4.0, при температуре 60°C, Время гидролиза 1 ч при концентрации 0,02%. Эти условия привели к лизису мембраны бактерий с извлечением 93.2% и 94% -ной чистоты ПГА. Результаты показали, что применение ферментных препаратов для экстракции полимера является эффективным процессом, который помогает в разрушение клетки *Cupriavidus necator* [21].

1.2.7 Центрифугирование и химическая обработка

Исследование восстановления П(ЗГБ) путем центрифугирования в сочетании с химической обработкой для эффективное удаление клеточного материала, не содержащий ПГА гранулы. Чистота полимера составляет 98,5%, извлечение П(ЗГБ) 80% были достигнуты из последующих трех этапов центрифугирования [22]. Применения смешенного метода экстракции для *E. coli*, путем объединения гомогенизации, центрифугирование и обработка гипохлоритом натрия. Извлечение П(ЗГБ) составило 80% при чистоте 96.5% было получено в оптимизированном процессе [23].

1.2.8 Гомогенизация под высоким давлением с использованием растворителя

Влияние использования гомогенизатор высокого давления в сочетании с применением растворителя, карбонат пропилен, в извлечение ПЗГБ *Cupriavidus necator*, направленных на увеличение извлечения. Во-первых, была выполнена обработка биомассы с гомогенизатором высокого давления в два прохода при 1300 бар для разрушения клеток, а затем клетки суспендировали в растворителе при нагревании. Наконец, полимер осаждали осадителем (вода). Более высокие результаты извлечения (94,4%) и чистоты (99%) полимера для этого комбинированного метода экстракции были получены при температуре экстракции 150 °C, время контакта клеток с растворителем 5 мин и соотношение растворителя к биомассы 1 мл/0,15 г. По мнению авторов, обработка биомассы под высоким давлением перед применением растворителя, приведет к эффективной экстракции, позволяющей сократить время экстракции от 45 мин до 5 мин. Данная комбинация методов может обеспечить экономию энергии и времени процесса и получения полимера с сохраненной молекулярной массой [19].

1.2.9 Применение ферментов и растворителей

Был разработан метод извлечения ПГА из *S. necator* с участием тепловой обработки, ферментативного гидролиза и растворения полимера в хлороформе. Гликозидазы гидролизировали клеточный материал после термической обработки в автоклаве в течение 15 мин при 121 °С для последующей дестабилизации клеточной стенки и облегчения ферментативного гидролиза [19]. Celumax BC® обеспечивает лучший лизис бактериальной клетки при 60°C и pH 4,0 [21]. Выделение ПГА было выполнено с добавлением хлороформа и последующего центрифугирования, в котором получали раствор полимера в растворителе (хлороформе). После испарения растворителя, произошло образование полимерной пленки с 94,5% извлечением ПГА и с 91% чистоты [19].

1.2.10 Осмотический шок

Для данной экстракции испытывают 3 различных состояния осмотических толчков: гиперосмотический шок с насыщенными растворами хлорида натрия или сахарозы, состояние гипоосмотического шока с деионизированной водой. Также был испытан другой вид гипоосмотического шокового воздействия путем замораживания образцов при - 80 ° С и оттаивание в течение 24 часов. Для каждого испытания 0,5 г образца биомассы смешивали с 20 мл соответствующим раствором. Затем образцы помещали в орбитальный шейкер при 200 об / мин и 30°C, в течение 1 часа. Затем образцы центрифугировали (8000 об/мин, в течение 10 минут при 10 ° С), гранулы ресуспендируются в деионизированной воде и их снова помещают в шейкер в тех же условиях [24].

1.2.11 Ультразвуковая экстракция

Разрушение мембраны клеток с помощью ультразвука была использована в нескольких процессах разделения для получения биопродуктов из микроорганизмов [25]. В данном методе ультразвуковые волны (высокой частоты) передаются с помощью металлической обоймы к жидкой системе (суспензии клеток) с помощью гравитационных пузырьков, образуя своего рода поле в рамке, а далее происходит последовательное увеличение массы и переноса тепла в жидкую среду, создавая градиент скорости и силы, способную дестабилизировать клеточные стенки [26].

1.2.12 Метод шаровой мельницы

В этом методе используется измельчитель, изготовленный из стеклянных шариков в контейнере, содержащий суспензию клеток. Разрушение мембраны клеток в шаровой мельнице происходит от удара шара с биомассой, который способствует передаче энергии от шара и последующее разрушение клеток [12].

Эффективность разрушения клеток в шаровой мельнице зависит от нескольких параметров, таких как время пребывания, сдвигающих сил, штамма микроорганизма, концентрации суспензии клеток и скорости перемешивания. Недостатком этого способа является то, что есть большое количество помех, которых нужно тщательно подбирать, таких как геометрия дугогасительной камеры, скорости и типа мешалки, размера шаров, число шаров, диаметр шариков, концентрация клеток и температура, возможность разрыва полимерных цепей [21].

1.2.13 Метод селективной флотации

Выделение ПГА из бактерий *Pseudomonas putida*, ферментированных путем брожения, может осуществляться методом селективной флотации. Чистота процесса зависит от селективности процесса агрегации и воздействия неселективного транспорта воды для создания пузырьков воздуха, растворенного в воде. Наблюдаемую агрегацию частиц смеси можно объяснить с помощью расширенной ДЛФО теории (Ван-дер-Ваальсовых, электростатических и гидрофобных взаимодействий) только когда учитывается отталкивание щеточного узла. Эта дополнительная сила отталкивания, скорее всего, играет решающую роль в предотвращении агрегации при определенных условиях. Агрегаты, образовавшиеся вблизи изоэлектрической точки клеточных отходов и включений в ПГА, обеспечили высокую чистоту полимера. С этими агрегатами чистота в 86% была получена в трех последовательных сериях флотации, где вклад неселективного транспорта в жидкой фазе был существенным.

Показано, что без неселективного транспорта чистота полимера в этом процессе будет доходить до 95%. Количество выделенного полимера, в основном, зависит от фракции полимерных включений, которые не объединяются и слишком малы по своим размерам для эффективной флотации [27].

2 Объект и методы исследования

2.1 Биосинтез бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646

Технологический цикл процесса синтеза полимеров (ПГА) состоит из следующих операций и стадий:

- приготовление технологических сред;
- стадия приготовления растворов;
- стерилизация полученных растворов;
- подготовка питательных сред;
- получение инокулята из музейной культуры в колбах;
- масштабирование: получения инокулята в ферментёре-инокуляторе;
- двустадийная ферментация в производственном ферментёре;
- концентрирование бактериальной культуры;
- центрифугирование сгущенной культуры и получение пасты биомассы;
- лиофильная сушка биомассы;
- выделение и очистка полимера;
- сушка, анализ и затаривание продукта (ПГА) [34].

2.1.1 Приготовление питательных растворов и их стерилизация

В отделении средоподготовки реализуются следующие стадии технологического цикла:

- стадия приготовления маточных растворов;
- стадия стерилизации.

Вся посуда (колбы, пробирки) предварительно должна быть простерилизована в автоклаве насыщенным водяным паром при давлении 0,1013 МПа. Для приготовления маточных растворов берут соответствующие

навески сухих солей и растворяют дистиллированной водой при комнатной температуре. В качестве минеральной среды используется смесь из четырёх маточных растворов: А, Б, В, Г. Растворы готовятся из расчёта на производственную программу.

Раствор А – расчётное количество фосфата калия и фосфата натрия растворяют в дистиллированной воде при перемешивании.

Раствор Б – навеску сульфата магния растворяют в дистиллированной воде.

Раствор В - навеску железа лимоннокислого вносят в ёмкость, дистиллированной водой и кипятят до полного растворения. Затем раствор доводят водой до метки.

Раствор Г – в ёмкость вносят поочередно навески солей, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают до полного растворения.

Растворы: А; Б; В; Г; стерилизуются при температуре плюс 120°C, давлении 0,11 МПа в течение 45 минут.

Раствор глюкозы готовят с концентрацией 500 г/л. Полученный раствор насосом перекачивают в ёмкость через предфильтр и стерилизующий фильтр.

Раствор карбамида готовят с концентрацией 60 г/л. Полученную смесь насосом перекачивают в ёмкость через стерилизующий фильтр. Для получения воды для приготовления питательных сред и получения инокулята используют аквадистиллятор электрический производительностью 25 л/ч.

В качестве пеногасителя в процессе культивирования используется подсолнечное масло. Для приготовления стерильного пеногасителя необходимо подсолнечное масло (примерно 50 мл) залить в колбу мерную на 100 мл, закрыть ватно-марлевой пробкой и обернуть бумагой, бумагу подвязать верёвкой. Стерилизовать в автоклаве при 1 атм., 121 °C, 30 мин. На рисунке 1 представлена блок — схема средоподготовки [40].

2.1.2 Получение инокулята из музейной культуры

После стерилизации в колбах готовят среду и вносят культуру *C. eutrophus* В-10646 [34]. Музейную культуру, хранящуюся на скошенной агаризованной среде в холодильнике, смывают с поверхности среды (4 пробирки) в стерильную коническую колбу ёмкостью 2 л с 1 л полной средой Шлегеля. Оптическая плотность исходного инокулята (без разведения), не менее 0,1 (440 нм). Все работы ведутся с соблюдением асептики. После чего колбы устанавливают в шейкер-инкубатор Innova 44 и инкубируют в течение 20–22 ч при 30 °С. Инкубирование проводится до получения оптической плотности не менее $0,2 \pm 0,02$ [40].

2.1.3 Получения инокулята в ферментёре-инокуляторе

Полученный инокулят переносят в ферментёр-инокулятор Bioengineering NLF 22 объемом 30 литров. Ферментер-инокулятор, объемом 30 литров, предназначен для получения не менее 10 л посевной культуры, необходимой для загрузки пилотного ферментера, объемом 150 литров.

Процесс выращивания биомассы в ферментёре-инокуляторе длится 5 ч в режиме хемостата [34].

2.1.4 Двустадийная ферментация в производственном ферментёре

Полученный инокулят в количестве 10-20 л поступает в производственный ферментёр Bioengineering тип Р-сосуд объемом 150 литров.

После завершения процесса стерилизации и трансферта инокулята, в окне управления ферментёра выставляются параметры процесса ферментации:

- температура плюс $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$;
- концентрация растворённого кислорода $\text{dO } 25 \pm 7 \%$ (каскадное управление);
- обороты мешалки 100-700 оборотов в минуту (каскадное управление). В процессе культивирования аппаратчик должен контролировать концентрацию питательных субстратов (глюкозы и мочевины), а также следить за основными технологическими параметрами. Коррекция концентрации основных питательных субстратов (глюкоза, карбамид) производится аппаратчиком с помощью перистальтических насосов [40].

Культивирование осуществляется в две стадии. На первой стадии происходит накопление биомассы в течение 24 ч до концентрации 40–50 г/л. На данном этапе используются подпитывающие растворы солей азота и глюкозы. На второй стадии лимитируют подачу азота (подпитывающий раствор карбамида или раствор мочевины). В этот момент концентрация клеток перестаёт увеличиваться, а содержание полимера в клетках растёт. Длительность стадии составляет 30 ч [36].

2.1.5 Концентрирование бактериальной культуры

После процесса ферментации полученная культуральная жидкость сливается в сборник, откуда далее поступает в вакуум-выпарную установку «УВВ-50», где концентрируется до 300 – 350 г/л, а затем перистальтическим насосом Ismatec Flowmaster FMT300 подается в сборник упаренной суспензии [40].

2.1.6 Центрифугирование и лиофильная сушка сгущенной культуры

Упаренную суспензию подвергают дальнейшему концентрированию в центрифуге Avanti. После центрифугирования бактериальную биомассу в виде сырой пасты переносят на подносы-лотки для дальнейшей сушке [34]. Бактериальную биомассу в виде сырой пасты с влажностью 50-60 % высушивают лиофильно в сублимационной установке IlshinBioBase (Корея); замороженную до температуры минус 40 °С биомассу высушивают нагреванием до +20 °С при давлении в камере 40 Па. Бактериальная паста загружается в подносы-лотки, и проходит лиофилизацию в лиофильной сушилке для получения сухой биомассы. Далее высушенная биомасса используется для выделения полимера. Получают биомассу с влажностью не более 0,5 %. [35].

2.2 Объект исследования

Объектом исследования являются образцы лиофильно высушенной бактериальной биомассы *Cupriavidus eutrophus* B-10646 (с влажностью 3%).

2.3 Методы исследования

Оптимизацию процесса экстракции ПГА проводили с использованием математического метода планирования эксперимента по плану Бродского, которая позволит оценить влияние входных параметров на полноту извлечения ПГА [28]. Выбор данной таблицы обоснован тем, что позволяет определить влияние факторов при минимальном количестве проделанных экспериментов. Эксперимент был проведен по типу дробной реплики с тремя уровнями четырех переменных факторов: температура экстракции – 30° С, 45° С, 60° С; продолжительность экстракции – 0,5 ч, 1 ч, 1,5 ч;

концентрация этилового спирта – 70 %, 83 %, 96%; соотношение экстрагента (этилового спирта) к биомассе бактерий, (м/м) – 4:1,6:1,8:1. Выбор факторов основывается на изучении литературы по данной тематике. По мнению авторов, данные входные параметры оказывают наибольшее влияние на экстракцию ПГА [24].

Эксперименты были проведены в нескольких повторностях (5-6). Выходным параметрам эксперимента (Y) является: полнота извлечения ПГА в %. Матрица планирования дробного эксперимента представлена в таблице 1. Основные факторы и уровни их вариации представлены в таблице 2.

Таблица 1 - Матрица планирования дробного четырехфакторного эксперимента с тремя уровнями вариации фактора

№	Температура, °С	Время, мин	Концентрация этанола, %	Этанол: Биомасса м/м
1	0	0	0	0
2	1	0	1	1
3	2	0	2	2
4	0	1	1	2
5	1	1	2	0
6	2	1	0	1
7	0	2	2	1
8	1	2	0	2
9	2	2	1	0

ВЫВОДЫ

1. Реализована технология культивирования бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 на опытном производстве ПГА, и получены образцы бактериальной биомассы для дальнейших исследований.

2. Исследовано влияние технологических параметров обработки биомассы этанолом на полноту извлечения и характеристики ПГА. Установлено, что изменение технологических параметров экстракции этанолом в исследованном диапазоне позволяет влиять на полноту извлечения полимера, а также его чистоту и не оказывает существенное влияние на его молекулярно-массовые характеристики. Использование этанола с концентрацией 96 % в соотношении этилового спирта к биомассе бактерий 8:1 при температуре экстракции 45°С в течение 60 мин обеспечивает выход 80 % ПГА с чистотой более 96%.

3. Уравнение $Y = 61.35 - 5.34 X_1 + 2.02 X_2 + 4.82 X_3 + 6.65 X_4$ (12) дает представление о количественном влиянии каждого фактора на выход ПГА в процессе экстракции и показывает возможное управление этим процессом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alarfaj A. A. Extraction and characterization of polyhydroxybutyrates (PHB) from *Bacillus thuringiensis* KSADL127 isolated from mangrove environments of Saudi Arabia / A. A. Alarfaj, M. Arshad, E. N. Sholkamy, M. A Munusamy // Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2015. – Vol.5, №58. – P. 781-788.
2. Bossio J. P. Detection and degradation of organic contaminants in an agricultural soil amended with alkaline-treated biosolids / J. P. Bossio, J. Harry, C. A. Kinney // Can. J. Soil Sci – 2014. – Vol. 94. – P. 595–604.
3. Brodsky V.Z Introduction to the Factorial Design of Experiments (Mathematical Foundations) /Manhattan Academia – 2013. – P. 44.
4. Bugnicourt E. Polyhydroxyalkanoate (PHA): review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging / E. Bugnicourt, P. Cinelli, A. Lazzeri, V. Alvarez // Express Polym. Lett.. – 2014. – № 11. – P. 791–808.
5. Divyashree M.S. Effect of gamma irradiation on cell lysis and polyhydroxyalkanoate produced by *Bacillus flexus* / M.S. Divyashree, T.R. Shamala // Radiation Physics and Chemistry. - 2009. – Vol.78, №2. - P. 147 – 152.
6. Filomena Doutora Maria Andrade de Freitas : Investigation of the Adhesive Properties of Bacterial Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates (mcl-PHA) for Medical Applications // Theses and studies in the field of biological diversity- 2016. - P. 13.
7. Gurtovenko A. A. Interaction of ethanol with biological membranes: the formation of non-bilayer structures within the membrane interior and their significance/ A. A. Gurtovenko J. Anwar //The Journal of Physical Chemistry – 2009. - P. 1983–1992.
8. Heinrich1 Daniel Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite./ Daniel Heinrich1,

Mohamed H Madkour, Mansour A Al-Ghamdi, Ibraheem I Shabbaj and Alexander Steinbuchel Heinrich et al. AMB Express. – 2012. – P 234.

9. Hejazi P. Supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* for poly(3-hydroxybutyrate) recovery / P. Hejazi, E. Vasheghani-Farahani, Y. Yamini // Biotechnology Progress. – 2003. – №19. – P. 1519–1523.

10. Ipsita Roy. Polyhydroxyalkanoate (Pha) Based Blends, Composites and Nanocomposites./ Ipsita Roy, P. M. Visakh - RSC Green Chemistry No. 30, 2014. – P. 47.

11. Jacquel Nicolas Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates)/ Nicolas Jacquel , Chi-Wei Lo, Yu-Hong Wei ,Ho-Shing Wu, Shaw S. Wang // Biochemical Engineering Journal – 2008. – Vol. 39(1). – P. 15– 27.

12. Jong-il Choi Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals / Jong-il Choi, Sang Yup Lee // Biotechnology and Bioengineering – 1999. – Vol . 62. – P. 546–553

13. Kapritchkoff F. M. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha* / F.M. Kapritchkoff, P.A.Viott, R.C.P. Alli, M. Zuccolo, J.G.C Pradella, A.E. Maiorano, E. A. Miranda, A. Bonomi // Journal of biotechnology. – 2006. – Vol. 122, №. 4. – P. 453– 462.

Khosravi-Darani K. Application of Supercritical Fluid Extraction in Biotechnology/ K. Khosravi-Darani , E. Vasheghani-Farahani // Journal Critical Reviews in Biotechnology – 2008. – Vol. 25. – P. 231-242.

14. Koller M. Extraction of short-chain-length poly-[(R)-hydroxyalkanoates] (scl-PHA) by the “anti-solvent” acetone under elevated temperature and pressure / M. Koller, R. Bona, E. Chiellini, G. Braunegg // Biotechnology Letters. – 2013. – № 35. – P. 1023–1028.

15. Kunasundari B. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates / B. Kunasundari, K. Sudesh // eXPRESS Polymer Letters. – 2011. – Vol.5. №7. – P.620 – 634

16. Ling Y. Recovery of poly-3-hydroxybutyrate from recombinant *Escherichia coli* by homogenization and centrifugation / Y. Ling, D.R.G. Williams, C.J. Thomas, A.P.J. Middelberg // Biotechnol. Technol. – 1997. – Vol. 11. – P. 409.
17. Linton E. A Synthetic Biological Engineering Approach to Secretion-Based Recovery of Polyhydroxyalkanoates and Other Cellular Products / Elisabeth Linton / Utah State University. – 2010. – P. 161.
18. Mikkili I. Isolation, Screening and Extraction of Polyhydroxybutyrate (PHB) producing bacteria from Sewage sample / I. Mikkili, A. P Karlapudi, T.C. Venkateswarulu, J. Babu D., S.B. Nath, V. P. Kodali // International Journal of PharmTech Research. – 2014. – Vol.6, №2. – P. 850 – 857.
19. Mohammadi M . Recovery and purification of intracellular polyhydroxyalkanoates from recombinant *Cupriavidus necator* using water and ethanol / M. Mohammadi, A. M. Hassan, L-Y. Phang, H. Ariffin, Y. Shirai, Y. Ando // Biotechnology Letters. – 2012. – № 2. – P. 253–259.
20. Neves A. Use of Enzymes in Extraction of Polyhydroxyalkanoates Produced by *Cupriavidus necator* / A. Neves, J. Muller // Biotechnology Progress. - 2012. – Vol. 28, №6. – P. 1575 – 1580
21. Paramjeet Khandpur Study on Production, Extraction and Analysis of Polyhydroxyalkanoate (PHA) from Bacterial Isolates./ Khandpur Paramjeet, E.T. Jabeen, K.V.L Rohini, Y. Varaprasad, B. Laxminarayana-IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSRJPBS) ISSN : 2278-3008 – Volume 1, Issue 1 – (May-June 2012).
22. Quines Luci K. M. METHODS OF EXTRACTION OF POLYHYDROXYALKANOATES FROM BACTERIAL BIOMASS / Luci K. M. Quines, Mélodi Schmidt, Kellen Zanfonato, Willibaldo Schmidell e Gláucia M. F. Aragão // Quím. Nova vol. 38 – 2015. – P. 1207–1218.
23. Rawte T. A rapid hypochlorite method for extraction of polyxydroxy alkanoates from bacterial cells/ T. Rawte S. , Mavinkurve. // Indian Journal of Experimental Biology – 2002. – Vol.40. – P 924–929.

24. Salmiati, Recovery of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from Mixed Microbial Cultures by Simple Digestion and Saponification. / Salmiati, Z. Ujang , M.R. Salim, G. Olsson - The 3rd IWA-ASPIRE. Conference 8 Exhibition, Taipei, Taiwan. – October 18-22, 2009.
25. Scott Gerald Degradable Polymers: Principles and applications./ Gerald Scott, Dan Gilead. – 1995. – P 89.
26. Tan G-Y. A. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review / Tan G-Y. A. C. Chia-Lung, L. Li , L. Ge, L. Wang, I. M. N. Razaad, Y. Li, L. Zhao, Y. Mo, J-Y. Wang // Polymers. – 2014. – № 6. – P. 706–754.
27. Van Hee P. Selective recovery of polyhydroxyalkanoate inclusion bodies from fermentation broth by dissolved-air flotation //Journal of colloid and interface science. – 2006. – №. 2. Vol . 297. – P. 595–606.
28. Yasotha K. Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration / K.Yasotha, M. K. Aroua, K. B. Ramachandran, I. Tan // Biochemical Engineering Journal. – 2006. – № 30. – P. 260–268.
29. Барановский С. В. Культивирование микроорганизмов в ферментере BioFlo115 (7,5л.) [Электронный ресурс] : методические указания к лабораторному практикуму / С. В. Барановский, А. В. Демиденко, Е. Г. Киселев. - Красноярск: СФУ, 2016. – Режим доступа : <http://publishing.sfu-kras.ru/content/uchebno-metodicheskoe-posobie-1615>
30. Введение в биотехнологию. Версия 1.0 [Электронный ресурс] : метод. указания по лаб. работам / сост. : Т. Г. Волова, Н. А. Войнов, Е. И. Шишацкая, Г. С. Калачева. – Электрон. дан. (2 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2008.
31. Влияние различных факторов на протекание процесса экстракции [Электронный ресурс] / Режим доступа: <https://znaytovar.ru/new740.html>

32. Воинов Н. А. Полигидроксиалканоаты - биоразрушаемые полимеры гидроксипроизводных алкановых кислот: синтез, свойства, области применения [Электронный ресурс] / Н. А. Воинов, Т. Г. Волова // Медицинский сайт MedBe.ru – 2013. – Режим доступа: <http://medbe.ru/materials/problems-i-metody-biotekhnologii/poligidroksialkanoaty-biorazrushaemye-polimery-gidroksiproduktov-ykh-alkanovykh-kislot-sintez-svoys/>
33. Воинов Н.А. Современные проблемы и методы в биотехнологии [Электронный ресурс] : электронный учебный методический комплекс / Н. А. Воинов, Т. Г. Волова, С.В. Маркова, Л.А. Франк, Е.И. Шишацкая . – Красноярск, ИПК СФУ, –2009. – С. 288.
34. Волова Т.Г. Полиоксиалканоаты (ПОА) - биоразрушаемые полимеры для медицины/ Волова Т.Г., Севастьянов В.И., Шишацкая Е.И. – Новосибирск, Издательство СО РАН. – 2003. – С. 330.
35. Дорожкин В.П. Химия и физика полимеров: учебное пособие / Нижнекамск– Нижнекамский химико-технологический институт, 2013 – С. 189.
36. Жила Н.О. Характеристика культуры *Cupriavidus eutrophus* B-10646, синтезирующей полигидроксиалканоаты при росте на сахарах и липидных субстратах / Н. О. Жила, Т. Г. Волова, Г. С. Калачева // Журнал Сибирского Федерального Университета. Сер. 2. Биология. – 2014. – № 2. – С.161–173.
37. Киселев Е. Г. Масштабирование технологии синтеза биodeградируемых полигидроксиалканоатов в условиях опытного производства / Е. Г. Киселев, А. В. Демиденко, С. В. Барановский, Т. Г. Волова // Журнал Сибирского Федерального Университета. Сер. 2. Биология. – 2014. – № 7 – С. 134–147.
38. Киселев Е. Г. Техничко-технологические основы биосинтеза резервных полигидроксиалканоатов водородными бактериями : автореф. дис.

... канд. биол. наук : 03.01.06 / Киселев Евгений Геннадьевич. – Красноярск. – 2012. – С. 20.

39. Киселев Е.Г. Сравнительное исследование методов экстракции полигидроксиалканоатов из биомассы бактерий. / Е.Г. Киселев, А.В. Демиденко: Журнал СФУ, Биология. – 2014 (7). – С. 148 – 160


40. Сутягин В. М. Основные свойства полимеров: учебное пособие / В. М. Сутягин, О. С. Кукурина., В. Г. Бондалетов; Национальный исследовательский Томский политехнический университет. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета. – 2010. – С. 96.

41. Сырвачева Д. А. Микробиологический синтез и характеристика полигидроксиалканоатов, содержащих мономеры среднецепочечного 3-гидроксигексаноата : дис. ... канд. биол. наук : 03.02.03 / Сырвачева Дарья Анатольевна. – Красноярск. – 2016. – С.138.

42. Терлецкая В. А. Влияние технологических факторов на процесс экстракции плодов рябины черноплодной / В. А. Терлецкая, Е. В. Рубанка, И. Н. Зинченко // Техника и технология пищевых производств № 4. – 2013. – С. 127-132.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
 Т.Г. Волова

« 18 » июля 20 18 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Влияние технологических параметров экстракции на выход и характеристики
ПГА, синтезируемые бактериями *Cupriavidus eutrophus*

Руководитель


подпись, дата

доцент, канд. техн. наук

должность, учёная степень

С.В. Барановский

инициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата

О.Д. Петровская

инициалы, фамилия

Красноярск 2018